乙烯对绞股蓝皂苷生物合成关键酶基因表达和皂苷含量的影响

王婷[1,2]，张世鑫[2]，潘凤溜[1]，彭小列[1]，田维敏[2*]，刘世彪[1*]
（1.吉首大学生物资源与环境科学学院，湖南 吉首 416000；2. 中国热带农业科学院橡胶研究所，海南 儋州 571737）

摘要：以药食两用植物绞股蓝为材料，研究了植物激素乙烯对绞股蓝皂苷生物合成关键酶基因表达及皂苷含量的影响。实验采用荧光定量 PCR 技术，检测了乙烯利处理后绞股蓝不同器官中皂苷生物合成关键酶基因 *GpFPS*，*GpSS* 和 *GpSE* 的表达水平；采用分光光度法及 HPLC 技术，测定了乙烯利处理对绞股蓝总皂苷和皂苷单体 Rb_1、Rb_3 和 Rd 含量的影响。结果表明：外施乙烯利能够不同程度地上调 *GpFPS*，*GpSS* 和 *GpSE* 基因的表达水平，且 3 个基因的表达模式在不同器官间不同，而在同一器官中相似。在乙烯利处理后 3 d，所测各器官中的总皂苷含量与对照相比均有所上升，其中根、成熟叶和幼叶达到显著水平，但 3 个皂苷单体在不同器官中的增加或降低并不一致，以 Rb_3 含量最高。该结果为探索利用植物激素调控绞股蓝皂苷次生代谢提供了参考。

关键词：绞股蓝，乙烯，绞股蓝皂苷，基因表达

中图分类号：Q943 **文献标识码**：A

Effects of ethylene on gypenoside biosynthesis-related key enzyme gene expression and gypenoside content in *Gynostemma pentaphyllum*

WANG Ting[1,2], ZHANG Shixin[2], PAN Fengliu[1], PENG Xiaolie[1], TIAN Weimin[2*], LIU Shibiao[1*]
（1. *College of Biology and Environmental Science*, *Jishou University*, Jishou 416000, Hunan, China；2. *Rubber Research Institute*, *CATAS*，Danzhou 571737, Hainan, China）

Abstract: The effects of plant hormone ethylene on gypenoside biosynthesis-related key enzyme gene expression and gypenoside content in medicine-food plant *Gynostemma pentaphyllum* were analyzed in this study. Fluorescence quantitative PCR was employed to test the expression levels of *GpFPS*, *GpSS* and *GpSE*, key enzyme genes in saponin biosynthesis pathway in different organs of *G. pentaphyllum* treated with ethephon, while spectrophotometry and HPLC were used to assay the contents of total gypenoside and saponin monomer Rb_1, Rb_3 and Rd in *G. pentaphyllum*. The results revealed that the expression levels of *GpFPS*, *GpSS* and *GpSE* genes were up-regulated by addition of ethephon in different extent, and the expression patterns of these three

---

基金项目：国家自然科学基金(31760044, 31260039)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760044, 31260039)]。

作者简介：王婷（1992-），女，硕士，贵州遵义人，研究方向为植物生态学，(E-mail)1690383633@qq.com。

***通信作者**：刘世彪，博士，教授，研究方向为发育植物学和植物资源学，(E-mail)liushibiao_1@163.com。

genes were dissimilar in different organs, but similar in the same organ. The contents of total gypenoside in all organs increased when compared with the control, and those in root, mature leaf and young leaf arrived at significant level 3 days after ethephon treatment. However, the three saponin monomers increased or decreased in organs were inconsistency, with Rb_3 had the highest content. The results provide reference for the research of using plant hormone to regulate the secondary metabolism in *G. pentaphyllum*.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*, ethylene, gypenoside, gene expression

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)又名五叶参、七叶参、七叶参胆、小苦草、遍地生根等，为葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物。绞股蓝可制成保健茶，也作为野菜食用，入药则具有降血压、降血脂、助消化、延缓衰老、调节神经系统和免疫功能的作用，属于重要的药食两用植物（Yan et al., 2014；Wang et al., 2018；彭小列等，2017）。绞股蓝体内的主要药用成分为绞股蓝皂苷（gypenoside），现已分离得到结构明确的绞股蓝皂苷201种（范冬冬等，2017）。绞股蓝皂苷在结构上和人参皂苷类似，绞股蓝皂苷3、4、8分别与人参皂苷Rb_1、Rb_3、Rd 结构相同，其生物合成途径也与人参相同。

人参皂苷属于四环三萜类化合物，是类异戊二烯代谢途径中三萜类合成支路的产物，其生物合成分为三个阶段。第一阶段：通过甲羟戊酸途径（mevalonate pathway，MVA）和2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径（methylery-thritol phosphate pathway，MEP），合成主要的中间产物异戊烯基焦磷酸（isopentenyldiphosphate，IPP）与二甲烯丙基二磷酸（dimethylallyl diphos-phate，DMAPP）；第二阶段：IPP和DMAPP被牻牛儿基焦磷酸合成酶（geranylgeranyl pyrophosphate synthase，GPS）、法呢基焦磷酸合成酶（farnesyl diphosphate synthase，FPS）、鲨烯合成酶（squalene synthase，SS）和鲨烯环氧酶（squalene epoxidase，SE）催化合成 2，3-氧化鲨烯；第三阶段：2，3-氧化鲨烯经过环化、羟基化、糖基化等过程后，最终形成Rb_1、Rb_3、Rd等不同类型的人参皂苷（赵灿等，2015；林彦萍，2016）。

乙烯（ethylene，ET)是一种植物内源激素，能够广泛调控植物生长发育、抵抗逆境及次生代谢产物合成等生理活动（方俊华等，2014；Zhao et al., 2005）。乙烯已用于提高具有一定药用价值的植物次生代谢产物产量，如用乙烯利刺激檀香植株，能够增加檀香叶中总黄酮的含量（文海涛等，2010），在红豆杉细胞培养中添加 0.018 mL L^{-1} 的乙烯可大幅度提高紫杉烷的产量（Pan et al., 2000)。在对五加科植物人参的研究中已有报道，乙烯可以作为信号分子调节人参的生长发育和人参皂苷的积累（Bae et al., 2006）。而乙烯对皂苷积累的影响与其对鲨烯合成酶和鲨烯环氧酶基因基因表达的诱导有直接的关系，如用乙烯前体 1- 氨基环丙烷羧酸(ACC)处理人参培养细胞可以诱导鲨烯合成酶和鲨烯环氧酶基因的转录表达，并能导致皂苷含量的上升（Xu et al., 2005），因此可以确认乙烯对人参皂苷类生物合成具有必然的影响，但其影响机制尚不明确（Rahimi et al., 2015）。绞股蓝是除五加科以外唯一的含有人参皂苷的植物，被誉为“南方人参”，那么植物

激素乙烯对绞股蓝的影响是否与对人参的影响模式相类似，目前尚未见报道。本文研究了外源乙烯利（一种乙烯释放剂）对绞股蓝皂苷生物合成关键酶 FPS、SS 和 SE 的基因表达、绞股蓝总皂苷及皂苷单体 Rb_1、Rb_3 和 Rd 含量的调控作用，旨在探讨乙烯对绞股蓝皂苷类物质合成积累的影响机制，为发展绞股蓝的高效栽培技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为扦插扩繁的绞股蓝植株，种植在人工培养室中，温度25 ℃，相对湿度60%，12 h光照，光照强度40 μmol m^{-2} s^{-1}。培养40 d。实验处理时插口有须根生长，但无根状茎发育。选取长势一致且长出10~12片新叶的植株，以0.5%乙烯利喷施叶面至溶液即将流出叶片为准，对照植株喷施超纯水。分别在乙烯利处理后的2 h、6 h和3 d取样，在每个时间点分别取5株的幼叶、成熟叶、茎和根。用于PCR分析的材料立即投入液氮中备用，用于皂苷含量测定的材料在60 ℃烘箱中烘干24 h至衡重，干燥器中保存备用。每个处理取3次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

RNA prep Pure Plant Kit [天根生化科技（北京）有限公司，DP441]试剂盒说明，提取绞股蓝各组织的总RNA，使用 DNase I去除 RNA 样品中的微量 DNA。采用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit（Thermo Fisher Scientific Inc.，K1662)，按照 1 μg 的总 RNA 量，进行等量反转录合成 cDNA。

1.2.2 荧光定量 PCR 分析

在 NCBI 数据库中搜索本研究的绞股蓝各基因的序列，使用 primer premier 6.0 软件设计基因的荧光定量 PCR 引物序列如表 1。

表 1 本研究使用的引物信息

Table 1 Information of primer sequences in this study

基因名 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列（5’-3’） Primer sequence（5’-3’）
Gp18SrRNA	*Gp18SrRNA*-qFW	5’-ACGATGCCGACCAGGGATT-3’
	Gp18SrRNA-qRW	5’-TTCAGCCTTGCGACCATACTC-3’
GpFPS	*GpFPS*-qFW	5’-CATTGAAGCCCACCCTAGCA-3’
	GpFPS-qRW	5’-TGCCTAAACAATTGAGCCAGG-3’
GpSS	*GpSS*-qFW	5’-TTGCTCTCGTTATTCAACAG-3’
	GpSS-qRW	5’-TCTATGCTTGTATCGTCCTC-3’
GpSE	*GpSE*-qFW	5’-GACTTAACGGAGCCTGAC-3’

GpSE-qRW	5’-CTTCTCACGCATCCTCTG-3’

荧光定量反应体系为 10 μL，其中 2×SYBR Premix 5 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL (引物浓度为 10 μmol·L^{-1}，反应体系中每条引物终浓度均为 0.2 μmol·L^{-1})、cDNA 模板 2 μL、ddH_2O_2 2 μL。qPCR 反应在 Bio-Rad 公司的 CFX 实时荧光定量 PCR 仪中进行，按仪器使用说明书进行操作，qPCR 反应程序：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 10 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 10 s，共 40 个循环；然后进行溶解曲线分析。利用 CFX manager 3.0 软件自动进行基线和 Cq 值分析。根据 $Q=2^{-\Delta\Delta Cq}$ 计算基因的表达值。

1.2.3 总皂苷与皂苷单体测定

1.2.3.1 总皂苷的测定

参考宋小妹等（1998）的方法，采用超声波提取法提取粗总皂苷，用色谱甲醇溶解烘干的粗总皂苷，定容至 10 mL，即制成总皂苷样品溶液；采用比色法测定总皂苷含量，以购置于中国药品生物制品鉴定所的绞股蓝总皂苷（≥98%）为标准品，在波长 550 nm 处测定吸光度。以吸光度（*A*）为纵坐标 *Y*，浓度（*C*）为横坐标 *X* 进行线性回归，得到回归方程 Y=1.5596X-0.0662 (R^2=0.998 8)。将制备好的总皂苷样品溶液按上述方法进行检测，所得数据按标准曲线方程换算成总皂苷含量。

1.2.3.2 皂苷单体的测定

参考史美荣（2015）的高效液相色谱法测定皂苷单体。绞股蓝皂苷单体标准品（≥98%）用孔径为 0.22 μm 的滤膜进行过滤，注入进样小瓶中。使用安捷伦（Agilent Technologies）的高效液相色谱仪进样进行 HPLC 检测，检测的条件如表 2 所示。根据已有的高效液相色谱条件测定峰面积，由已知的浓度和得出的峰面积进行方程计算，以浓度 *X* 为横坐标，峰面积 *Y* 为纵坐标绘标准曲线，得出直线回归方程 Rb_1：Y=22.726X-99.254 (R^2=0.918 2)；Rb_3：Y=45.997X-33.976 (R^2=0.999 2)；Rd：Y=44.715X-65.191 (R^2=0.999 5)。将制备好的皂苷样品溶液按上述方法检测，所得数据按标准曲线方程换算成皂苷单体含量。

表 2 绞股蓝皂苷单体含量测定的 HPLC 条件

Table 2 HPLC conditions for determination of gypenoside monomers in *Gynostemma pentaphyllum*

色谱柱 Chromatographic column	ZORBAX Eclipse Plus C_{18}
柱温 Column temperature	25 ℃
流速 Velocity	0.8 mL.min^{-1}
流动相	A（水）-B（乙腈）
Mobile phase	A(Water) -B(Acetonitrile)
0 min	A:B=65%:35%
0~20 min	A:B=65%-60%:35%-40%
检测波长 Detection wavelength	203 nm
进样量 Injection volume	20 μL

1.2.4 数据处理

用 Excel 2007 整理数据，处理组和对照组之间的差异显著性分析用 SPSS 20 软件进行单因素 AVONA 检验。*表示差异显著(P<0.05)，**表示差异极显著(P<0.01)。

2 结果与分析

2.1 乙烯处理对绞股蓝皂苷生物合成关键酶 FPS、SS 和 SE 基因表达的影响

乙烯对绞股蓝根、茎、成熟叶和幼叶中的皂苷生物合成关键酶 FPS、SS 和 SE 基因表达的影响如图 1 所示。在根中，*GpFPS* 呈明显上调表达，且 2 h 和 6 h 的表达量显著高于对照，6 h 的表达量最大，至处理后 3 d 时与对照无显著差异；根中的 *GpSS* 在 6 h 时的表达量显著高于对照，但 2 h 和 3 d 的表达量与对照没有显著差异；根中的 *GpSE* 在处理后 2 h 和 6 h 的表达量显著升高，3 d 时与对照几无差异。在茎中，*GpFPS* 呈极显著上调表达，2 h 表达量最大，然后表达量逐渐降低，但均高于对照；茎中的 *GpSS* 在处理后 2 h 的表达量最大，显著高于对照，6 h 时与对照相似，到 3 d 时又显著上调；茎中的 *GpSE* 在处理珀 2 h 即达最高值，显著高于对照，其后两阶段急剧下降至对照水平。在成熟叶中，*GpFPS* 在 2 h 时与对照水平相当，到 6 h 和 3 d 显著上调表达，3 d 表达量达到最大值；*GpSS* 的表达量在 2 h 时显著低于对照，到 6 h 时已恢复到对照水平，3 d 时呈显著上调表达；*GpSE* 的表达水平则呈连续的显著上升趋势，至 3 d 时达最高。在幼叶中，*GpFPS* 的表达量呈明显的连续降低模式，2 h 和 6 h 显著高于对照，3 d 时显著低于对照；*GpSS* 在 2 h 时的表达量显著高于对照，6 h 时与对照无显著差异，3d 时有显著上升；*GpSE* 在 2 h 和 6 h 的表达量显著高于对照，以 6 h 最高，在 3 d 时降至对照水平。在根、茎和成熟叶三个器官中，*GpSE* 的表达模式与 *GpFPS* 的表达模式大致相似，在茎和幼叶中，*GpFPS* 和 *GpSS* 的表达模式大致相似。

总体来看，这三个基因在同一器官中响应乙烯利的表达模式相似。乙烯利处理后，在根中，*GpFPS*、*GpSS* 和 *GpSE* 均是在 6 h 时显著高于对照且表达量最大；在茎中，它们的表达量在 2 h 均达到最大值，且显著高于对照；在成熟叶中，这三个基因对乙烯利的响应表现为持续上调表达，在处理后 3 d 的表达量均达到最大值，且显著高于对照；在幼叶中，三个基因在乙烯利处理 2 h 的表达量均显著高于对照。

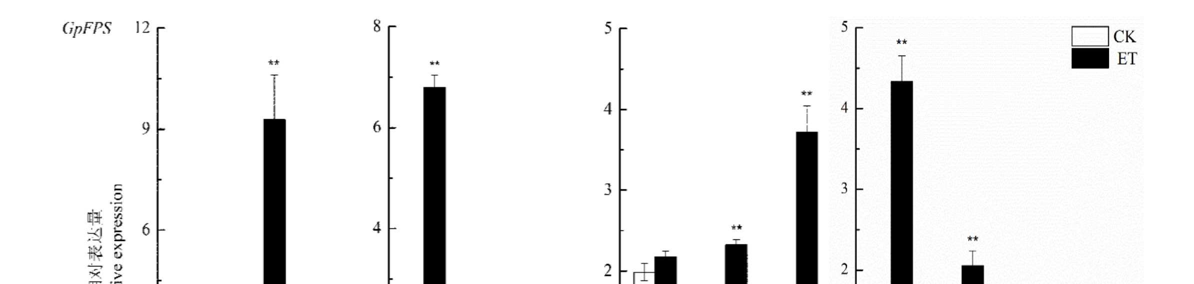


图 1 乙烯利处理对不同器官皂苷合成关键酶基因 *GpFPS*、*GpSS*、*GpSE* 表达的影响

Fig, 1 Effects of ethephon treatment on the expression of *GpFPS*, *GpSS* and *GpSE* , the genes encoding for key enzymes of gypenoside synthesis in different organs

2.2 乙烯处理对不同器官总皂苷和皂苷单体含量的影响

乙烯利处理 3 d 时的绞股蓝总皂苷和 3 种皂苷单体的含量如图 2 所示。处理植株的根、茎、成熟叶和幼叶的总皂苷含量平均值分别为 15.33、75.23、69.64 和 110.67（mg g^{-1} FW）。对照植株的根、茎、成熟叶和幼叶的总皂苷含量平均值分别为 7.84、61.75、37.53 和 80.67（mg g^{-1} FW）。差异显著性分析表明，处理植株的根、茎、成熟叶和幼叶的总皂苷含量均高于对照，其中根、成熟叶和幼叶达到显著水平，而茎与对照差异不显著。

乙烯利处理下绞股蓝 3 种皂苷单体的含量各不相同，其变化也不同于总皂苷含量。差异显著性分析表

明，只有茎的 Rb_1 含量显著高于对照，成熟叶和幼叶含量高于对照，而根的含量低于对照，但它们均未达到显著水平；根和茎的 Rb_3 含量显著高于对照，成熟叶和幼叶的 Rb_3 含量低于对照，但没有显著差异；Rd 在成熟叶中的含量显著低于对照，在根、茎和幼叶中与对照没有显著差异。总体来看，3 种单体在植株中的分布具有器官特异性，且 Rb_3 的含量高于其他 2 个单体。

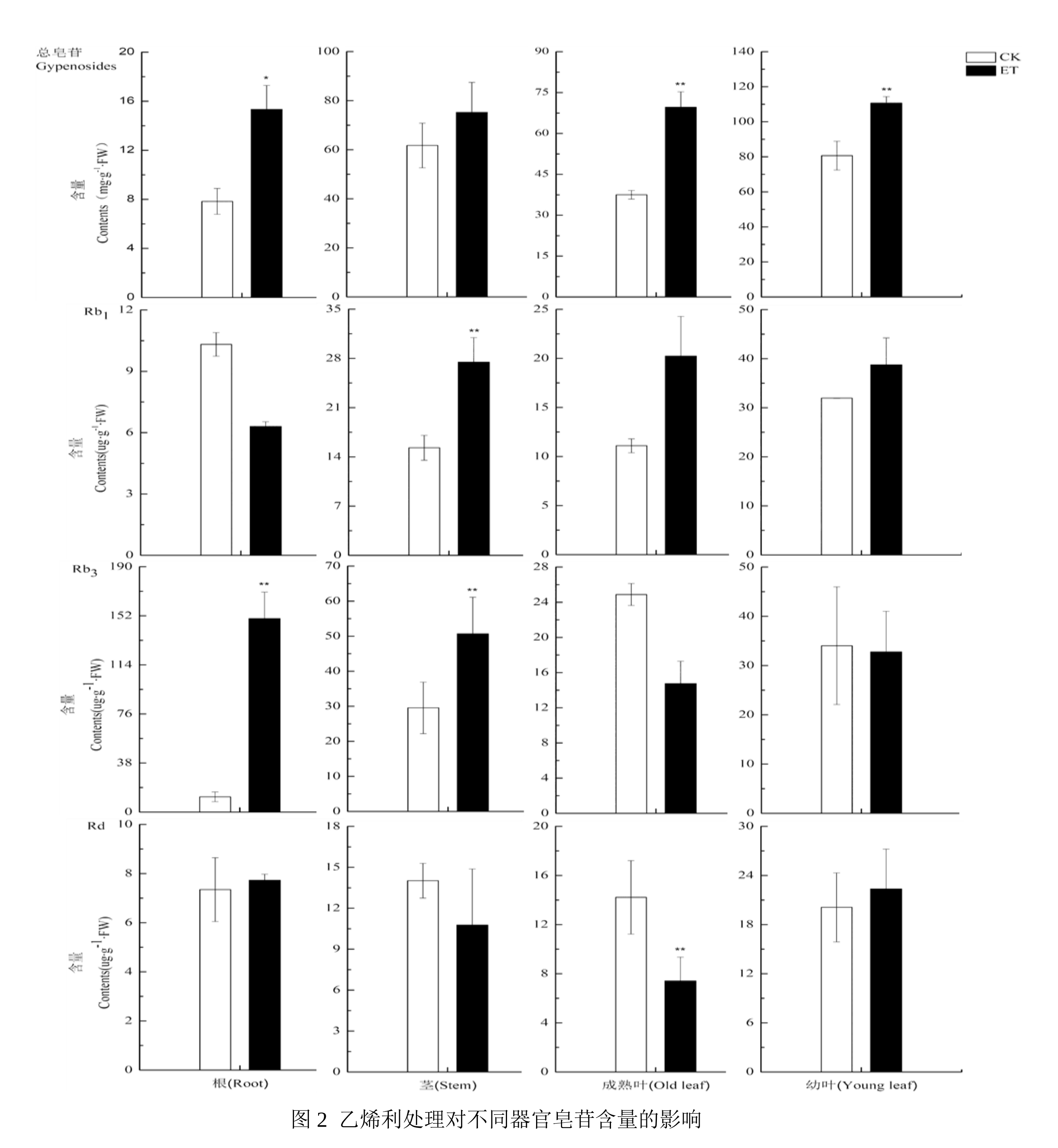


图 2 乙烯利处理对不同器官皂苷含量的影响

Fig, 2 Effect of ethephon treatment on the content of gypenoside in different organs

3 讨论与结论

植物激素可调控植物体内次生代谢产物的合成，乙烯也不例外，作为唯一的气态植物激素，它不仅是环境变化和植物发育、适应的桥梁（张睿等，2019），也常被作为外源激素添加到药用植物的培养基中，用于增加有效药用成分的产量，这方面国内外已有若干报道。Xu et al.（2005）在研究单线态氧对人参培养细胞的影响时，发现用乙烯处理人参细胞，能促进皂苷合成，而当乙烯生产被阻碍时，皂苷合成也被抑制，说明乙烯是皂苷合成所必需的基本信号。Bae et al.（2006）也报道 50 μmol·L^{-1} 的乙烯利能加强人参根的生长和人参皂苷的积累，但 100 μmol·L^{-1} 则会抑制皂苷的积累。这不仅说明乙烯可以作为信号分子调节人参的生长发育和调节皂苷的积累，同时它又对次生代谢产物有着双重调控作用，即在一定浓度范围内可以促进次生代谢产物的形成，高于一定浓度，则对次生代谢产物的形成起抑制作用。在本研究的对照植株中，幼叶的总皂苷含量最高，其次是茎和成熟叶，这与刘世彪等（2005）对自然生长的绞股蓝不同器官中的皂苷含量测定结果相符。而用乙烯利处理绞股蓝植株后，则根、成熟叶和幼叶的总皂苷含量均显著增加，仅茎中的增加不显著，这说明乙烯确实能够促进绞股蓝总皂苷的合成和积累。

绞股蓝皂苷含量不仅具有地域差异性，而且具有单体种类差异性。史美荣等（2015）测定绞股蓝植株中人参皂苷 Rb_1、Rb_3、Rd 和绞股蓝皂苷 XLIX 和 XVII 共 5 种单体含量，发现 Rb_3 在绞股蓝植株里含量高。本文所测定的人参皂苷 Rb_1、Rb_3 和 Rd 种类，也证实 Rb_3 含量远高于 Rb_1 和 Rd。本研究不仅证明乙烯利处理对不同皂苷单体的含量有明显影响，而且具有器官特异性，例如乙烯利处理能显著增加根中的 Rb_3 及茎中的 Rb_1 和 Rb_3 单体的含量，但显著降低成熟叶中 Rd 含量，对幼叶中的这三种单体含量没有影响。由于绞股蓝皂苷的种类多样，受乙烯影响的皂苷单体不会局限于这 3 种。

法呢基焦磷酸合成酶（FPS）、鲨烯合成酶（SS）和鲨烯环氧酶（SE）是三萜皂苷生物合成途径中关键的一组酶，其基因的表达水平与皂苷的合成产量具有直接的关系。在人参培养细胞中添加 ACC（乙烯前体 1-氨基环丙烷羧酸，乙烯合成前体物），能够诱 *SS* 和 *SE* 的上调表达，明显增加皂苷的积累（Xu et al., 2005）。*SS* 和 *SE* 也是绞股蓝皂苷生物合成关键酶，我们最近已证明在不同光质处理下，绞股蓝这两种基因的表达量与其皂苷含量呈正相关关系（Wang et al., 2018）。在本研究中，对绞股蓝外施乙烯利也能显示出 *GpFPS*、*GpSS* 和 *GpSE* 的基因表达呈不同程度地上调，说明乙烯能够调节皂苷合成关键酶 FPS、SS 和 SE 的基因表达，并导致后续的皂苷含量增加。同时，本研究还发现这 3 个基因在不同器官间的表达模式不同，而在同一器官中的表达模式相似,表明这 3 个基因在 ET 刺激下，在同一器官中以集群协同的方式参与至绞股蓝皂苷的生物合成，但不同器官的绞股蓝皂苷合成并不同步；而且在乙烯利处理后 2 h 和 6 h，*GpSE* 和 *GpSS* 在幼叶中的表达量均高于成熟叶，这与用茉莉酸甲酯（MeJA）处理绞股蓝后这 2 个基因前期的上调表达模式相似（Guo et al., 2016；李茹芳等，2016），说明幼叶的皂苷合成能力更强。本研究结果有助于对乙烯调节绞股蓝皂苷合成机制的进一步了解，为利用乙烯等植物激素调控皂苷等次生代谢提供参考。但目前人们对乙烯与植物次生代谢物生成的关系和调控机制还了解得不多（Rahimi et al., 2015），比如乙烯是调节皂苷合成中的哪些过程，仅是基因表达阶段还是后续的过程？乙烯浓度的双重调控与基因表达和皂苷生成的关系等，都值得进一步研究。

参考文献：

BAE KH, CHOI YE, SHIN CG, et al., 2006. Enhanced ginsenoside productivity by combination of ethephon and

methyl jasmoante in ginseng (Panax ginseng CA Meyer) adventitious root cultures[J]. Biotechnol Lett, 28(15):1163–1166.

FAN DD, YAN YH, XIANG SZ, et al., 2017. Progress in the chemical constituents and pharmacological activities of Gynostemma pentaphyllum[J]. Chin Pharmaceut J, 52(5): 342-352.[范冬冬, 匡艳辉, 向世勰, 等, 2017. 绞股蓝化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 52(5): 342-352.]

FANG JH, ZHAO H, LIAO YH, et al., 2014. The dual regulation effect of ethylene on the synthesis of plant secondary metabolites[J]. Acta Bot Sin, 49(5):626-639. [方俊华, 赵华, 廖永辉, 等, 2014. 乙烯对植物次生代谢产物合成的双重调控效应[J]. 植物学报, 49(5) :626-639.]

GUO HH, LI RF, LIU SB, et al., 2016. Molecular characterization, expression, and regulation of *Gynostemma pentaphyllum* squalene epoxidase gene 1[J]. Plant Physiol Biochem, 109:230-239.

LI RF, LIU SB, ZHAO N, et al., 2016. Cloning, sequence and expression analysis of *GpSS1* gene of *Gynostemma* squalene and the effect of MeJA on its expression [J]. Chin Herb Med, 47(15): 2713-2720. [李茹芳, 刘世彪, 赵娜, 等, 2016. 绞股蓝鲨烯合成酶基因 GpSS1 的克隆、序列与表达分析及 MeJA 对其表达的影响[J]. 中草药, 47(15):2713-2720.]

LIN YP, ZHANG MP, WANG KY, et al., 2016. Research progress in ginsenoside biosynthesis [J]. Chin J Trad Chin Med, 41(23): 4292-4302. [林彦萍, 张美萍, 王康宇, 等, 2016. 人参皂苷生物合成研究进展[J]. 中国中药杂志, 41(23):4292-4302.]

LIU SB, LIAO HM, HU ZH, 2005. Relationship between the structure of vegetative organs and the total saponin content in *Gynostemma pentaphyllum*[J]. Wuhan Bot Res, 23(2): 144-148.[刘世彪, 廖海民, 胡正海, 2005. 绞股蓝营养器官各发育阶段结构与总皂甙含量相关性的研究[J]. 武汉植物学研究, 23(2): 144-148.]

PAN ZW, WANG HQ, ZHONG JJ.2000. Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene[J]. Enzy Microbiol Technol, 27: 714–723.

PENG XL, WANG T, LUO Z, et al.,2017. Analysis of nutrient composition of three plants of *Gynostemma* spp.[J]. J Mount Agric Biol, 36(1): 89-91. [彭小列, 王婷, 罗准, 等, 2017. 绞股蓝属三种植物的营养成分分析[J]. 山地农业生物学报, 36(1): 89-91.]

RAHIMI S, KIM YJ, YANG DC, 2015. Production of *ginseng* saponins: elicitation strategy and signal transductions[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 99: 6987-6996.

WANG T, WU XY, LIU SB, et al., 2018. Effect of light quality on total gypenosides accumulation and the related key enzyme gene expression in *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Chin Herb Med, 10(1):34-39.

WEN HT, ZHAO HY, LIN LI, et al., 2010. Effect of ethephon stimulation on total flavonoids content in *Sandalwood* leaves[J]. J Guangzhou Univ Traditional Chin Med, 27(2):156-158. [文海涛, 赵红英, 林励, 等, 2010. 乙烯利刺激对檀香叶中总黄酮含量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 27(2):156-158.]

XU X, HU X, NEILL SJ, et al., 2005. Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* C.A. Meyer[J]. Plant Cell Physiol, 46:947–954.

SHI MR, LI H, BAI G, et al., 2015. Determination of five saponins in *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC[J]. Sci Technol Food Indus, 36(2): 49-52.[史美荣, 李华, 白鸽, 等, 2015. HPLC 法测定绞股蓝中 5 种皂苷成分的含量[J].食品工业科技, 36(2):49-52.]

SONG XM, CUI JC, QIANG J, et al., 1998. Ultrasonic extraction of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum*[J]. Chin Patent Med, 20(5): 4-5. [宋小妹, 崔九成, 强军, 等, 1998. 超声波提取绞股蓝总皂苷的工艺研究[J]. 中成药, 20(5): 4-5.]

YAN H, WANG X, NIU J, et al., 2014. Anti-cancer effect and the underlying mechanisms of gypenosides on human colorectal cancer SW-480 cells[J]. PLoS ONE, 9 (4): 1–10 .

ZHAO J DAVIS LC,VERPOORTEe R, 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary

metabolites[J]. Biotechnol Adv, 23(4):283-333.

ZHAO C, GUO L, PENG YS, et al., 2015. Key enzymes in the biosynthesis of *Panax notoginseng* saponins and their regulation [J]. Chin Herb Med, 46 (19): 2954-2965. [赵灿, 郭丽娜, 彭玉帅, 等, 2015. 三七总皂苷生物合成的关键酶及其调控研究进展[J]. 中草药, 46(19):2954-2965.]

ZHANG R, WANG XJ, GAO WEI. 2019. Regulation of plant hormones on secondary metabolites [J]. Chin J Trad Chin Med, https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20190129.007. [张睿, 王秀娟, 高伟, 2019. 植物激素对次生代谢产物的调控研究[J].中国中药杂志, https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20190129.007]